



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 49/00, 49/04, 9/127	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/08626 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. April 1994 (28.04.94)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/00997</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Oktober 1993 (13.10.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 35 381.5 16. Oktober 1992 (16.10.92) DE P 43 28 331.4 18. August 1993 (18.08.93) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SACHSE, Andreas [DE/DE]; Bonhoefferufer 8, D-10589 Berlin (DE). SCHNEIDER, Thomas [DE/DE]; Rheingaustrasse 23, D-12161 Berlin (DE). RÖSSLING, Georg [DE/DE]; Oranienburger Chaussee 60c, D-13465 Berlin (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: SACHSE, Andreas; Bonhoefferufer 8, D-10589 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, NO, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>

(54) Title: **PROCESS AND DEVICE FOR PRODUCING LIQUID, DISPERSED SYSTEMS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR HERSTELLUNG FLÜSSIGER, DISPERSER SYSTEME**

(57) Abstract

The description relates to a continuous process for producing liquid, dispersed systems in which a pre-dispersion is sequentially extruded at high pressure of 6.6 to 250 MPa through 1 to 8 filter stages with decreasing pore sizes between 0.01 and 35 μm . There may be up to 20 passages per filtering stage. The description also relates to a device which may be used to implement the process of the invention.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein kontinuierliches Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Vordispersion unter hohem Druck von 6,6 bis 250 MPa sequentiell über 1 bis 8 Filterstufen absteigender Porengröße zwischen 0,01 und 35 μm extrudiert, wobei bis zu 20 Passagen pro Filtrationsstufe angewendet werden können. Ferner wird eine Vorrichtung beschrieben, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens dienen kann.

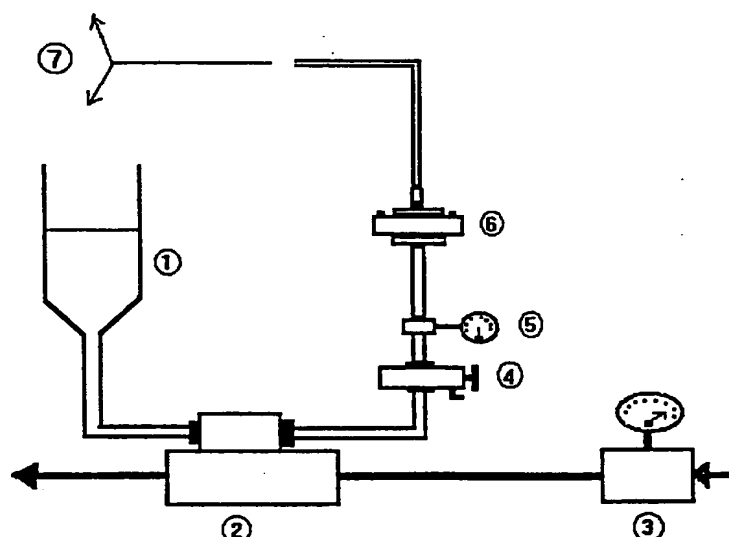


Diagram of a device of the invention

Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Apparatur

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme.

Neben der kosmetischen Industrie besteht vor allem in der pharmazeutischen Industrie ein großer Bedarf an Verfahren und Vorrichtungen zur Herstellung disperser Systeme. Dies gilt insbesondere aus dem Grunde, weil man bei der Suche nach neuen Möglichkeiten des Arzneistofftransports sogenannte Arzneistoffträgersysteme (drug-delivery systems) entwickelte, die disperse Systeme (insbesondere fest/flüssig oder flüssig/flüssig) darstellen. Hierunter zu nennen sind beispielsweise Emulsionen (flüssig/flüssig) für die parenterale Ernährung oder Darreichung schlecht wasserlöslicher Arzneistoffe und insbesondere Liposomensuspensionen, welche als zielgerichtete Arzneistoffträger Anwendung finden können.

Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen entstehen nach Dispersion von Phospholipiden in Wasser spontan geschlossene Lipidvesikel, welche Liposomen genannt werden. Bei diesen handelt es sich um sphärische oder elliptische Hohlkörper mit einer oder mehreren Lipiddoppelschichten ("bilayer"), welche eine wäßrige Phase einschließen. Gemäß ihrer Größe unterscheidet man hierbei kleine, unilamellare (small unilamellar vesicles [SUV] mit Radien von 25 bis 50 nm) und große, unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles [LUV] mit Radien größer 50 nm bis zu 10 µm) (Weiner, N., Martin, F., Riaz, M., Drug Dev. Ind. Pharm. 15, 1523-1554 (1989)).

Ferner kennt man multilamellare Liposomen (multilamellar vesicles [MLV]), bei denen mehrere konzentrisch angeordnete bilayer vorliegen sowie multivesikuläre Liposomen (multivesicular vesicles [MVV]), welche in ihrem Lumen wiederum vesikuläre Strukturen aufweisen.

Die Liposomen eignen sich sowohl zum Einschluß hydrophiler als auch lipophiler Arzneistoffe, wobei Umfang und Ort des Einschlusses von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs und der Lipidzusammensetzung der Liposomen abhängig ist.

Alle Verfahren zur Herstellung von Liposomen beinhalten als wichtigsten Schritt die Dispersion des Lipids bzw. Lipidgemisches in einer wäßrigen Phase. Ausgehend hiervon, kann man sämtliche Herstellungsverfahren gemäß der drei Hauptdispersionsprinzipien einteilen. Hierbei unterscheidet man "mechanische

Dispersion" (mechanical dispersion) , "Zwei-Phasen Dispersion" (two-phase dispersion) und "Detergenz-Solubilisation" (detergent solubilization) (New, R. R. C. (Hrsgb.), Liposomes: a practical approach, Oxford University Press, New York, 1990, S. 33).

Bei den Methoden, die eine "Zwei-Phasen Dispersion" beinhalten, sind vor allem die begrenzte Löslichkeit einiger Lipide in organischen Lösungsmitteln sowie der hohe Aufwand bei der Entfernung der verwendeten Lösungsmittel (wie Chloroform, Methanol, Diethylether), zur Absenkung der Restlösemittelkonzentration auf tolerierbare Konzentrationen (Toxizität), nachteilig. Die "Detergenz-Solubilisationsmethoden" weisen den Nachteil des nur schwierig aus der Präparation zu entfernenden Restdetergenzgehalts auf.

Bei den sogenannten "mechanischen Dispersionsverfahren" wird demgegenüber auf die Verwendung organischer Lösungsmittel oder Detergenzien während der Dispersion des Lipids in der Wasserphase verzichtet. In der Regel wird hierbei zunächst ein Lipidfilm durch Rotationsverdampfung einer organischen Lösung des Lipids bzw. Lipidgemischs (zum Beispiel in Chloroform, Methanol oder Diethylether) gebildet. Zur vollständigen Entfernung des Restlösemittels erfolgt danach oftmals eine 12-24 stündige Lyophilisation bei hohem Vakuum. Durch anschließende Zugabe einer wäßrigen Phase und bloßes Schütteln (die sogenannte hand-shaken method nach Bangham, Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C., J. Mol. Biol. 13, 238-252 (1965)) erhält man eine MLV-Suspension die hinsichtlich der Liposomengröße und Lamellarität äußerst heterogen ist.

Zur Weiterverarbeitung entsprechender MLV-Suspensionen existieren mehrere Verfahren, bei denen in der Regel SUV oder LUV erhalten werden.

Die älteste und am weitesten verbreitete Methode zur Herstellung von SUV ist die sogenannte "sonication method" (Ultrabeschallungsmethode). Hierbei werden MLV durch Ultrabeschallung (Ultraschallstab oder Ultraschallbad) zerkleinert. Die so erhaltenen Liposomen haben einen mittleren Durchmesser von 20 bis 60 nm und eine Einschlußkapazität unter 1%. Die Nachteile dieser Methode liegen vor allem in der hohen Wärmezufuhr, die zu einer Zersetzung des Lipids bzw. des Arzneistoffs führen kann sowie in der Schwierigkeit auch größere Probenmengen reproduzierbar zu verarbeiten. Bei der Verwendung des Ultraschallstabs besteht darüberhinaus der Nachteil der Verunreinigung der Probe mit Titansplittern sowie der Bildung eines Aerosols (siehe die bereits zitierte Publikation von R.R.C. New).

Eine weitere Methode zur Herstellung von kleinen uni- oder oligolamellaren Liposomen ist die "french press method", deren Name auf die dabei verwendete Hochruckapparatur (french press) zurückgeht. Diese Anlage besteht aus einer elektrischen, hydraulischen Presse und einer Hochdruckzelle, die je nach Ausführung ein maximales Fassungsvermögen von 4 oder 40 ml aufweist (New R.R.C.; siehe oben). Nachteilig an dieser Methode ist neben dem begrenzten Volumen der zu verarbeitenden Dispersionen vor allem die Tatsache, daß die fertigen Liposomensuspensionen in der Regel mit Abriebrückständen der Druckkammer oder einem Anteil nicht zerkleinerter MLV kontaminiert sind sowie die Schwierigkeit den Temperaturanstieg in der Kammer zu kontrollieren.

In jüngster Zeit fanden auch sogenannte Hochdruckhomogenisatoren Eingang in die Liposomentechnologie. So wurde die Herstellung von SUV mit einem Kleinstmengenringspalthomogenisator aus MLV- oder Lipiddispersionen (ohne vorherige Filmbildung) beschrieben (Brandl, M., Bachmann, D., Drechsler, M., Bauer, K. H., Drug Dev. Ind. Pharm. 16, 2167-2191 (1990)).

Dieses Verfahren erlaubt die reproduzierbare Herstellung kleiner Mengen homogener SUV-Dispersionen mit sehr kleinen mittleren Durchmessern (< 50 nm).

Nachteilig ist aber vor allem das Auftreten von Geräteabrieb (Ringspalt etc.) sowie die schwierige Kontrolle der Produkttemperatur.

Neben den vorher beschriebenen Verfahren zur Herstellung von SUV gibt es auch mehrere mechanische Verfahren zur Herstellung von LUV, die ebenfalls unter Verwendung von Vordispersionen (Liposomen oder Lipid) arbeiten.

Das älteste dieser Verfahren ist die sogenannte "extrusion method". Bei diesem Verfahren wird eine MLV-Dispersion von Hand sequentiell über Filterhalter mit Polycarbonatfiltern absteigender Porengröße (3.0, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 und 0.2 µm) bei Drücken bis zu 0,35 MPa filtriert (Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., Papahadjopoulos, D., Biochim. Biophys. Acta 557, 9-23 (1979)).

Eine Weiterentwicklung dieser Extrusionsmethoden stellt die sogenannte "LUVET-Methode" (Large unilamellar vesicles by extrusion) dar (WO86/00238, 1986 und Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., Cullis, P. R., Biochim. Biophys. Acta 812, 55-65 (1985)). Bei diesem diskontinuierlichen Verfahren wird eine grobe Lipid- oder Liposomendispersion bei Drücken unterhalb 3,5 MPa mehrfach über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter mit Porengrößen kleiner/gleich 100 nm extrudiert. Hierbei erhält man unilamellare Liposomen mit einem Durchmesser von 60 bis 100 nm und einem Einschlußvolumen von 1 bis 3 l wäßrige Phase pro mol Lipid. Wird die Liposomensuspension unterhalb einer Lipidkonzentration von ca. 200 µmol

pro ml zusätzlich einigen freeze-thaw Zyklen (Einfrieren der Suspension und anschließendes Auftauen - Cullis, P. R., Mayer, L. D., Bally, M. B., Madden, T. D., Hope, M. J., Adv. Drug Delivery Rev. 3, 267-282 (1989)) unterzogen, so läßt sich eine Steigerung der Einschlußeffizienz feststellen. Bei Verwendung von Drücken von bis zu 5,5 MPa konnten sehr hohe Lipidkonzentrationen verarbeitet werden.

Bei den bei dieser Technik verwendeten Druckfiltergeräten, wird die Vordispersion in einen direkt über den Membranen liegenden Aufgußraum gegeben, das Druckgefäß verschlossen und anschließend mittels Druckluft oder Stickstoff der zur Filtration notwendige Druck aufgebaut. Das Filtrat wird über einen Auslaß entnommen und anschließend erneut bis zu 20 mal in den Aufgußraum zurückgeführt.

Ein Nachteil der Extrusionsmethoden liegt in der diskontinuierlichen Betriebsweise, den geringen Arbeitsvolumina sowie den niedrigen Filtrationsdrücken der kommerziell verfügbaren Geräte.

Ein relativ neues Verfahren stellt die Hochdruckhomogenisation mit dem sogenannten Microfluidizer™ dar (Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W.J., King, J., Green, A.M., Biochim. Biophys. Acta 775, 169-174 (1984)).

Bei dieser Methode wird eine MLV-Dispersion oder eine grobe, wäßrige Lipiddispersion zunächst in ein Reservoir eingebracht und mittels einer Hochdruckpumpe über einen Vorfilter (5 µm) in eine sogenannte Interaktionskammer gepreßt, in der der Flüssigkeitsstrom in Mikrokanälen in zwei Einzelströme aufgespalten wird, die anschließend mit hoher Geschwindigkeit wieder vereinigt werden. Nach Austritt aus der Interaktionskammer kann die erhaltene Dispersion entweder entnommen oder rezirkuliert werden.

Nachteilig bei diesem Verfahren ist vor allem das Auftreten von Metallabrieb in den fertigen Präparationen sowie die Tatsache, daß teilweise ein Verlust bzw. eine Zersetzung des Lipids beobachtet wird (Talsma, H., Özer, A.Y., van Bloois, L., Crommelin, D.J.A., Drug. Dev. Ind. Pharm. 15, 197-207 (1989)). Darüberhinaus läßt sich die Größe und Lamellarität der Liposomen nur über einen begrenzten Bereich reproduzierbar einstellen.

Bei der Herstellung von Emulsionen finden einfache, schnellaufende Rührer, Mixbecher, Rührer mit Rotor und Stator (z.B. Ultra Turrax) sowie Kolloidmühlen Verwendung. Aufgrund verschiedener gerätetechnischer Nachteile sowie der schlechten Reproduzierbarkeit und den geringen Dispersitätsgraden, die mit diesen Geräten erzielt werden, haben sich neben der Ultrabeschallung (im Labormaßstab) vor allem die Hochdruckhomogenisationsverfahren, trotz der damit verbundenen Nachteile, bei der Emulsionsherstellung durchgesetzt (Praveen, T. (Hrsgb.): Specialized drug delivery systems, Drugs and the pharmaceutical sciences, Bd. 41,

Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 1990, S. 317 ff.). Hierbei sind vor allem der Ringspalthomogenisator der Firma APV Gaulin (Lübeck, Deutschland) bzw. der Microfluidizer™ zu nennen, deren Anwendung z.B. zur Herstellung von Emulsionen für die parenterale Ernährung bereits beschrieben ist (Washington, C., Davis, S.S., Int. J. Pharm. 44, 169-176 (1988) und Muchtar, S., Jacobs, G.P., Benita, S., Tenside Surf. Det. 26, 347-351 (1989)).

Das erfindungsgemäße kontinuierliche Verfahren zur Herstellung flüssiger Dispersionen hat die aufgezeigten Nachteile der vorbekannten Verfahren nicht. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vordispersion unter hohem Druck von 6,6 bis 250 MPa sequentiell über 1 bis 8 Filterstufen absteigender Porengröße zwischen 0,01 und 35 µm extrudiert, wobei bis zu 20 Passagen pro Filtrationsstufe angewendet werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise bei einem Arbeitsdruck von 7 bis 80 MPa durchgeführt. Die Extrusion kann dabei auf jeder Filtrationsstufe über jeweils einen oder eine Kombination aus 2 - 4 Filtern gleicher oder unterschiedlicher Porengröße erfolgen. Hierbei werden zumeist Membranfilter wie zum Beispiel Polycarbonatmembranen (Oberflächenfilter) etwa der Firma Nucleopore (Tübingen) verwendet.

Im Gegensatz zu den vorbekannten Verfahren sind aber auch andere Filter entsprechender Differenzdruckfestigkeit aus unterschiedlichsten Materialien und in den unterschiedlichsten Geometrien (wie zum Beispiel Filterscheiben, -tassen oder -kerzen) zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet. Geeignete Filter sind Metall- bzw. Polymermembranen oder anorganische Materialien wie beispielsweise Glasfaser- oder Anopore®-Membranen (Fa. Anotec, Banbury Oxon, England). Beispiele für geeignete Polymermaterialien sind Filter aus Polytetrafluorethylen (PTFE), Polypropylen (PP), Polyvinylidenfluorid oder Celluloseestern wie beispielsweise Celluloseacetat.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Erfindung nicht nur ein Verfahren zur Herstellung von flüssigen Dispersionen betrifft, sondern auch eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens. Diese Vorrichtung, welche als kontinuierlich arbeitende Hochdruckextrusionsapparatur bezeichnet werden kann (s. Abb. 1), ist gekennzeichnet durch ein Vorratsgefäß (1), dessen Abflußleitung zu einer Hochdruckpumpe (2) führt, die zum Aufbau von Arbeitsdrücken von maximal 250 MPa ausgelegt ist. Ausgangsseitig ist diese Pumpe mit einem zur Aufnahme der erfindungsgemäß verwendeten Filter bestimmten Filterhalter (6) verbunden von dem das Produkt über

eine Abflußleitung (7) entweder in das Vorratsgefäß rezirkuliert und/oder entnommen wird.

Vorzugsweise ist die Hochdruckpumpe zum Aufbau von Arbeitsdrücken bis maximal 80 MPa ausgelegt. Zwischen Hochdruckpumpe und Filterhalter kann gegebenenfalls noch ein Vorfilterhalter angebracht sein, der zur Aufnahme von Filtern mit einer mittleren Porengröße von 2 bis 35 µm bestimmt ist. Ferner kann die erfindungsgemäße Vorrichtung noch mit Entlüftungsvorrichtungen und/oder Temperatur- und Druckmeßgeräten ausgestattet sein.

Geeignete Pumpen für die erfindungsgemäße Vorrichtung sind beispielsweise pneumatische oder hydraulische Kolbenpumpen (zum Beispiel Maximator®, Fa. Schmidt, Kranz & Co., Zorge, Deutschland). Geeignete Pumpen sind üblicherweise solche, die einen Umspannfaktor von etwa 50 bis 750 aufweisen und somit aus 0,1 bis 0,4 MPa Eingangsdruck (Luft oder Stickstoff) Arbeitsdrücke zwischen 5 und 300 MPa erzeugen können. Zweckmäßigerweise werden die erfindungsgemäßen Vorrichtungen mit einem Regelventil (3) versehen, mittels dessen Hilfe der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren anzuwendende Druck gezielt eingestellt werden kann. Bei hohem Druck können dann auch große Mengen an Dispersion mit hohen Konzentrationen an disperser Phase (beispielsweise 500 mg Lipid pro ml wässriger Phase) und dementsprechend hoher Viskosität (gelartig) extrudiert werden, was bei den vorbekannten Verfahren in der Regel nicht möglich ist. Die hierbei resultierenden Produktflüsse liegen in der Regel zwischen 0,1 und 10 Litern pro Minute, vorzugsweise bei 0,15 bis 3 Litern pro Minute.

Durch die hohen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren anwendbaren Drücke wird ferner das bei anderen Methoden auftretende Problem der Verstopfung der Filter beseitigt, wodurch Unterbrechungen des Prozesses zum Wechseln der Filter entfallen.

Das in der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendete Vorratsgefäß kann so gestaltet sein, daß es temperierbar ist, die Leitungen können Metallröhren oder Schlauchleitungen sein. Alternativ hierzu kann die Produktrückführung auch über ein Zweikammervorratsbehältnis oder eine Flüssigkeitsspirale gegebenenfalls auch mit Wärmetausch erfolgen.

Wenn die Vorrichtung zur Herstellung pharmazeutischer Präparate verwendet werden soll, müssen alle produktberührenden Teile derselben sterilisierbar und beständig gegen die in ihr verwendeten Lösungsmittel sein. Vorzugsweise ist die Vorrichtung aus solchen Materialien gefertigt, die eine Hitzesterilisation zulassen.

Im Gegensatz zu den meisten vorbekannten Vorrichtungen ermöglicht es die erfindungsgemäße Hochdruckextrusionsapparatur, flüssige Dispersionen kontinuierlich und in größeren Mengen herzustellen, wodurch der Herstellungsaufwand für die Dispersionen signifikant gesenkt und somit die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens deutlich verbessert wird.

So hat die in den Ausführungsbeispielen verwendete Apparatur beispielsweise Filterhalter, die die Verwendung von Membranfiltern von 47 mm Durchmesser gestatten. Das Druckhaltevermögen des hierbei verwendeten Filterhalters beträgt 80 MPa. Diese Vorrichtung erlaubt die rasche Herstellung von Dispersionen im Bereich von 100 bis 1000 ml (Totvolumen der Anlage etwa 10 ml). Bei der Verwendung von zwei Filtern mit 47 mm Durchmesser mit einer Porengröße von kleiner/gleich 100 nm lassen sich mit dieser Vorrichtung Flüsse erzielen, die deutlich oberhalb 150 ml pro Minute liegen.

Bei entsprechender Auslegung der Apparatur ist jedoch auch die Herstellung im Technikums- und Produktionsmaßstab ohne eine negative Beeinträchtigung der Produkteigenschaften möglich. Bei einer entsprechenden Auslegung der Vorrichtung (Pumpenleistung, Filtergeometrie, Rohrverbindungen etc.) kann man mit den entsprechenden Anlagen die erzielbare Flußrate auf weit über 3 l pro Minute erhöhen. Alternativ ist aber auch eine Auslegung solcher Anlagen für sehr kleine Produktmengen möglich, wo dies zum Beispiel aus ökonomischen Gründen erwünscht ist.

Bei Vorrichtungen, bei denen nach erfolgter erster Dispersion eine Rückführung des Produktes erfolgen soll, ist es oft zweckmäßig, daß die Dispersion zunächst in einem Zweikammersystem aufgefangen wird, um diese dann durch bloßes Öffnen eines entsprechenden Ventils erneut in die Anlage zurückzuführen. Dieses Zweikammersystem bietet gegenüber der direkten Rezirkulation den Vorteil, daß immer zunächst die Gesamtmenge der Dispersion dem Scherprozeß unterworfen wird und keine Vermischung von undispergierter und dispergierter Phase auftritt. Der gleiche Effekt kann auch über die Rezirkulation der Dispersion über eine Flüssigkeitsspirale erfolgen, welche das Gesamtvolumen des zu verarbeitenden Ansatzes faßt. Hierbei kann gleichzeitig eine Temperierung der Dispersion über die Außenwände der entsprechenden Spirale erfolgen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist nicht nur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet, sondern sie kann auch bei Anwendung niedrigerer Drücke im Bereich von 1 bis 6,6 MPa von Nutzen sein.

Die mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung durchführbaren erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung flüssiger Dispersionen sind von besonderer Bedeutung in der pharmazeutischen und kosmetischen Liposomentechnologie, da sie eine wirtschaftliche Produktion großer Liposomenmengen mit reproduzierbaren Eigenschaften (wie zum Beispiel Einschlußmenge, Liposomengröße und -lamellarität) in pharmazeutischer Qualität (zum Beispiel Sterilität und Pyrogenfreiheit) erlauben.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Herstellung uni- oder multilamellarer Liposomen über einen weiten Grenzbereich (mittlerer Durchmesser in der Regel 25 nm bis 5 µm). Die Größe und Homogenität der Größenverteilung sowie die Lamellarität der hier erhaltenen Liposomen ist unter anderem eine Funktion der verwendeten Filterart, und Porengröße, des Filtrationsdrucks (Arbeitsdruck), der Anzahl der Passagen durch das Gerät, der Lipidart und -konzentration sowie der Art und Menge des eingesetzten Arzneistoffes. Mittels der üblichen Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, lassen sich durch eine geeignete Wahl dieser Parameter Formulierungen mit sehr enger Größen- und Lamellaritätsverteilung erhalten.

Bei der Liposomenbildung mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können die gleichen Lipidbestandteile eingesetzt werden, wie bei den übrigen Verfahren dieser Art. Derartige Lipide sind in der Regel Phospholipide wie beispielsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylinositol oder Sphingolipide. Darüberhinaus können als weitere Bestandteile Sterole wie beispielsweise Cholesterol oder auch andere Komponenten wie Fettsäuren (z.B. Stearinsäure, Palmitinsäure), Dicetylphosphat oder Cholesterolhemisuccinat eingesetzt werden. Bei Verwendung von amphiphilen Substanzen wie beispielsweise Hexadecylpoly(3)glycerol, Dialkylpoly(7)glycerol-ether und Alkylglucosiden werden sogenannte Niosomen, dies sind Liposomen aus nicht-ionogenen Vesikelbildnern, erhalten.

Mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich sowohl hydrophile als auch lipophile Arzneistoffe liposomal zu verkapseln. Geeignete Wirkstoffe sind beispielsweise Vitamine, Hormone, Antimycotica, Antiallergica, Antiphlogistica, Antihypertensiva, Antiarrhythmica, Antibiotika, Antiviralia, Anxiolytika, Cytostatika, Immunmodulatoren, Kontrazeptiva, Peptide, Proteine und Sedativa.

Im Falle von hydrophilen Arzneistoffen werden diese in der Regel in der zur Herstellung der Vordispersion verwendeten wässrigen Phase gelöst und nach Herstellung der Vordispersion dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfen. Hierbei können überraschenderweise Liposomen mit besonders hohen Einschlüssen erhalten werden.

So erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren unter anderem als besonders geeignet zur Verkapselung von Kontrastmitteln für die Röntgen (beziehungsweise Computertomographie) und NMR Diagnostik, die mit den bisher bekannten mechanischen Dispersionsmethoden nur unzureichend verkapselt wurden. Bei Einschluß von iodhaltigen Röntgenkontrastmitteln (RKM) können so auch bei kleinen Liposomendurchmessern und relativ geringen Lipidkonzentrationen hohe Einschlußkapazitäten erzielt werden. Durch Kombination mit einem oder mehreren freeze-thaw Zyklen (Einfrieren und Auftauen) läßt sich eine weitere Einschlußerhöhung erzielen. Besonders geeignete Beispiele für entsprechende RKM vom Typ der Triiodbenzoesäure sind Iopromid, Iohexol, Iopamidol, Ioversol, Iopentol, Ioxaglat, 3-Carbamoyl-5-[N-(2-hydroxyethyl)-acetamido]-2,4,6-triiod-benzoesäure-[(1RS, 2SR)-2,3-dihydroxy-1-hydroxymethylpropyl]-amid und Iotrolan.

Im Falle des Einschlusses von Kontrastmitteln für die NMR Diagnostik erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren im Hinblick auf die erzielbaren Einschlußkapazitäten gegenüber allen vorbeschriebenen mechanischen Verfahren überlegen. Durch bloße Hochdruckextrusion lassen sich extrem hohe Einschlüsse erhalten, die überraschenderweise durch zusätzliche freeze-thaw Zyklen nicht wesentlich weiter gesteigert werden können. Besonders für die Verkapselung geeignete NMR Kontrastmittel sind hierbei Gd-DTPA, Gd-EOB-DTPA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gadobutrol und Mn-DPDP (US-A 4,957,939, US-A 5,021,236 und Schuhmann-Giampieri, G., Inv. Radiol. 28, (1993) in press).

Alternativ hierzu können geeignete, wasserlösliche Substanzen auch mit sogenannten active loading techniques (remote loading) verkapselt werden. Hierzu werden beispielsweise zunächst arzneistofffreie Liposomen mittels der Hochdruckextrusionstechnik hergestellt, die anschließend, z.B. über einen pH-Gradienten, mit der zu verkapselnden Substanz beladen werden (Cullis, P. R., Mayer, L. D., Bally, M. B., Madden, T. D., Hope, M. J., Adv. Drug Delivery Rev. 3, 267-282 (1989)).

Zur Verkapselung lipophiler Substanzen kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der entsprechende Wirkstoff durch Lösen bzw. Dispergieren in der Lipid-Vordispersion bzw. durch nachträgliches Einrühren in eine fertige Liposomensuspension verkapselt werden. Bei solchen Arzneistoffen kann es sich auch um modifizierte

Arzneistoffmoleküle (amphiphile Substanzen) handeln, welche durch entsprechende chemische Modifikation direkt als Liposomenmembranbestandteile fungieren können. Übereinstimmend mit den bisher existierenden Liposomenpräparationsverfahren kann bei lipophilen Arzneistoffen von einer quantitativen Verkapselung der jeweiligen Komponente ausgegangen werden, solange ein kritisches Arzneistoff/Lipidverhältnis nicht überschritten wird. Insofern erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren auch hier als besonders geeignet, da durch die Verarbeitbarkeit extrem hoher Lipidkonzentrationen (> 400 mg/ml) auch extrem hohe Konzentrationen lipophiler Arzneistoffe dispergiert werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich gegenüber den bisher beschriebenen Herstellungsmethoden durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der produzierten Liposomeneigenschaften aus. So kann beispielsweise bei der mehrfachen Herstellung von kontrastmittelhaltigen Liposomen unter identischen Bedingungen nachgewiesen werden, daß die produzierten Liposomen nur geringe Schwankungen hinsichtlich ihrer Eigenschaften (vor allem Einschluß, Größe und Größenverteilung) aufweisen. Diese Reproduzierbarkeit des Verfahrens wird durch die Vergrößerung des Herstellungsmaßstabs nicht negativ beeinträchtigt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ferner besonders zur Durchführung unter aseptischen Bedingungen geeignet. Dies ist vor allem in solchen Fällen bedeutsam bei denen die gewünschten Liposomen aufgrund ihrer Größe keiner terminalen Sterilfiltration (0,2 µm) unterzogen werden können. Zur aseptischen Herstellung sind sterilisierte, entpyrogenisierte Geräte sowie sterile und pyrogenfreie Ausgangsstoffe einzusetzen und es ist in Reinräumen der entsprechenden Reinraumklassen zu arbeiten. In allen übrigen Fällen (d.h. letzte Extrusion kleiner/gleich 0,6 µm) kann das Endprodukt zumeist sterilfiltriert (z.B. 0,2 µm) werden. Darüberhinaus bietet das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit, durch Extrusion unter Verwendung von Filtern geeigneter Porengröße (kleiner/gleich 0,6 µm) von vornherein eine Entfernung von Keimen zu bewirken, wodurch eine nachträgliche Sterilfiltration entfallen könnte.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich darüber hinaus besonders zur Herstellung von lagerstabilen Liposomen. Im Falle der Lagerung von Iopromid-haltigen Liposomen, bei denen der unverkapselte Iopromidanteil nicht abgetrennt wird, kann so beispielsweise nach dreimonatiger Lagerung im Kühlschrank keine Abnahme des pH-Wertes und des Einschlusses sowie keine Veränderung der mittleren Durchmesser festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Herstellung von Emulsionen bietet das erfindungsgemäße Verfahren erstmals die Möglichkeit der kontinuierlichen Herstellung großer Emulsionsmengen mit reproduzierbaren Eigenschaften. Im wesentlichen kommen auch bei der Emulsionsherstellung die weiter oben aufgeführten Vorteile (Liposomenherstellung) des erfindungsgemäßen Hochdruckextrusionsverfahrens zum Tragen. Der vorher nicht beschriebene Einsatz der Filterextrusion in diesem Bereich, der erst durch das erfindungsgemäße Hochdruckextrusionsverfahren eröffnet wurde, ermöglicht die flexible Herstellung von Emulsionen über einen weiten Größenbereich (100 nm - 20 µm mittlerer Durchmesser der dispergierten Phase) ohne größeren apparativen Aufwand. Das Verfahren zeichnet sich auch in dieser Anwendung durch die Verarbeitbarkeit großer Mengen an innerer Phase aus, wobei zumeist auch eine Direktherstellung (ohne Vordispersion) möglich ist.

Je nach dem gewünschten Anwendungszweck lassen sich mit diesem Verfahren Zwei- bzw. Mehrphasenemulsionen (z.B. W/O, O/W, W/O/W oder O/W/O) herstellen.

Als Ölphase können dabei beispielsweise pflanzliche Öle wie Soja-, Rizinus-, Saflor- oder Olivenöl Verwendung finden. Geeignete Emulgatoren sind beispielsweise Ei- und Sojalecithine bzw. reine Phospholipide aus solchen Fraktionen. Ferner können beispielsweise auch nichtionische Tenside wie z.B. höhere Fettalkohole, Sorbitanfettsäureester oder Polyethylenglykolether bzw. -ester eingesetzt werden.

Die Wasserphase kann aus reinem Wasser (p.i. oder pur.) bzw. wässrigen Lösungen verschiedener Puffer- oder Salze (z.B. NaCl, KCl) bestehen und auch Zusätze wie beispielsweise Glycerol enthalten. Darüberhinaus können Emulsionen für die parenterale Ernährung zusätzlich Zucker wie Glucose und Xylitol sowie weitere Salze wie Natriumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid oder Zinkacetat enthalten. Darüberhinaus können auch Fette wie z.B. mittelkettige Triglyceride in der Emulsion vorhanden sein.

Ferner können in einer oder beiden Phasen Arzneistoffe bereits vor der Emulsionsherstellung gelöst oder suspendiert werden bzw. nach vollendeter Emulsionsherstellung, analog zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren, eingearbeitet werden. Die entsprechenden hydrophilen oder lipophilen Wirkstoffe können dabei beispielsweise den weiter oben (Liposomenherstellung) aufgeführten Substanzklassen zugehören.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele dienen zur näheren Erläuterung der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die hierbei verwendeten Abkürzungen sind folgende:

Chol:	Cholesterol, Cholesterol gepulvert, E. Merck, Darmstadt
DCP:	Dicetylphosphat, Sigma, St.Louis, MO, USA
EPC:	Eiphsphatidylcholin, Lipoid E 100, Lipoid KG, Ludwigshafen
EPS:	Eiphsphatidylserin, Lipoid EPS, Lipoid KG
PCS:	Photonenkorrelationsspektroskopie- Verfahren zur Messung von Teilchengrößen unter 1 µm
SPA:	Sojaphosphatidsäure, Lipoid SPA, Lipoid KG
SPC:	Sojaphosphatidylcholin, Lipoid S 100, Lipoid KG
SPE:	Sojaphosphatidylethanolamin, Lipoid SPE, Lipoid KG
SPG:	Sojaphosphatidylglycerol, Lipoid SPG, Lipoid KG
SS:	Stearinsäure, Fluka, CH-Buchs

A.) Ausführungsbeispiele betreffend die erfindungsgemäße Vorrichtung

Beispiel A 1:

Die Vorrichtung ist eine in Abbildung 1 schematisch dargestellte kontinuierlich arbeitende Hochdruckextrusionsapparatur.

Sie besteht aus einem temperierbaren Vorratsgefäß (1), welches über eine Rohrverbindung mit einer pneumatischen Kolbendruckluftpumpe (2) verbunden ist, die einen Umspannfaktor von etwa 250 aufweist. Die Kolbendruckluftpumpe wird mittels Stickstoff betrieben, wobei der Eingangsdruck über ein Einlaßventil (3) eingestellt wird. Von der Hochdruckpumpe führt eine Rohrverbindung über ein Entlüftungsventil (4) und ein Manometer (5) zu einem Hochdruckfilterhalter (6), welcher zur Aufnahme von Membranfilterscheiben mit einem Durchmesser von 47 mm geeignet ist. Die aus dem Filterhalter austretende Dispersion wird über eine Schlauchverbindung (7) abgeführt, die wahlweise zur Produktentnahme oder zur Produktrückführung in das Vorratsgefäß (1) dient.

Beispiel A 2:

Diese in Abbildung 2 schematisch dargestellte Vorrichtung ist ebenfalls eine kontinuierlich arbeitende Hochdruckextrusionsapparatur.

Sie unterscheidet sich von der in Abbildung 1 dargestellten Apparatur dadurch, daß hinter dem Manometer (5) noch ein Metalltassenvorfilter (6) mit einem Porendurchmesser von beispielsweise 35 µm eingebaut ist.

Ein weiterer Unterschied zu der in Abbildung 1 beschriebenen Apparatur besteht darin, daß die aus dem Filterhalter (7) austretende Schlauchverbindung zu einem

Zweikammervorratsgefäß (1) führt. Der Auslauf des oberen der zwei Gefäße (1a) ist mit einem Dreiwegeventil (1c) versehen, welches es erlaubt die darin befindliche Dispersion ganz oder teilweise zu entnehmen oder über das untere Gefäß (1b) erneut dem Hochdruckextrusionsprozeß zuzuführen.

B.) Ausführungsbeispiele betreffend das erfindungsgemäße Verfahren

Vorbemerkung: In den nachfolgenden Ausführungsbeispielen wird der mittlere Vesikeldurchmesser mittels PCS (Submicron particle sizer autodilute model 370, Fa. Nicomp Instr. Corp., Goleta, CA) bestimmt.

Beispiel B 1: Herstellung einer Liposomensuspension mit 50 mg SPC/ml

5 g SPC werden bei 50°C am Rotationsverdampfer in Ethanol gelöst und anschließend zum Film eingedampft.

Der erhaltene Film wird mit 100 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5) versetzt und nach 15-minütigem Quellen durch mindestens 2-minütiges Schütteln von Hand abgelöst. Die so erhaltene Vordispersion wird mit der erfindungsgemäßen Apparatur bei einem Arbeitsdruck zwischen 3 und 10 MPa jeweils 5 mal über 2 Polycarbonatmembranen absteigender Porengröße (5.0, 1.0, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 und 0.03 µm) sequentiell filtriert. Die erhaltene Liposomensuspension ist leicht opaleszierend und die Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 64 nm auf.

Beispiel B 2: Herstellung einer Liposomensuspension mit 200 mg SPC/ml

Herstellung wie Beispiel B 1 jedoch Einsatz von 20 g SPC bei der Filmbildung.

Die erhaltene Liposomensuspension ist leicht opaleszierend und die Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 73 nm auf.

Beispiel B 3: Herstellung einer Liposomensuspension mit 400 mg SPC/ml

Herstellung wie Beispiel B 1 jedoch Einsatz von 40 g SPC bei der Filmbildung.

Die erhaltene Liposomensuspension ist von gelartiger Konsistenz und die Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 74 nm auf.

Beispiel B 4: Herstellung einer Liposomensuspension mit 50 mg SPC/Chol/SPG (molares Verhältnis 6:3:1) pro ml

Herstellung wie Beispiel B 1 jedoch Einsatz von 5 g des Lipidgemisches zur Filmbildung. Die erhaltene Liposomensuspension ist stark transparent bis leicht opaleszierend und die Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 72 nm auf.

Beispiel B 5: Herstellung einer Liposomensuspension mit verringerter Anzahl an Extrusionsschritten

Herstellung und Zusammensetzung wie Beispiel B 4 jedoch Reduktion der Extrusionsstufen auf 0,4, 0,1 und 0,03 μm . Die erhaltene Liposomensuspension ist stark transparent bis leicht opaleszierend und die Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 68 nm auf.

Beispiel B 6 - B 18: Verwendung unterschiedlicher Lipide und Lipidgemische

Plazeboliposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen werden wie nachfolgend beschrieben produziert:

-Die Herstellung eines Lipidfilms erfolgt durch Rotationsverdampfung einer organischen Lipidlösung (Ethanol, Methanol oder Chloroform/Ethanol - je nach Löslichkeit) bei erhöhter Temperatur (z.B. 50° C).

-Der Lipidfilm wird mit Pufferlösung oberhalb der Phasenübergangstemperatur des verwendeten Lipidgemischs dispergiert (Quellzeit mind. 15 min, Schütteln von Hand - mind. 2 min)

-Die sequentielle Extrusion der Vordispersion (MLV) erfolgt über Filter absteigender Porengröße (5,0; 1,0; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 und gegebenenfalls 0,03 μm - je 5 Filterpassagen - gegebenenfalls bei erhöhter Temperatur).

In diesen Beispielen (B 6 - B 18) werden jeweils zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter pro Filtergröße verwendet, wobei die letzte Extrusion über 0,05 μm Filter erfolgt. Nach Abschluß der Extrusion werden die Liposomensuspensionen sterilfiltriert (Celluloseacetatmembran, 0,2 μm). Die eingesetzte Lipidkonzentration beträgt jeweils 50 mg/ml. Es werden 100 ml Ansätze in Puffer (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,5, im folgenden Tris-Puffer genannt) hergestellt.

Tabelle 1: Mittlere Durchmesser hochdruckextrudierter Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (Beispiele B 6 - B 18)

Lipidgemisch	Molare Zusammensetzung	Mittlerer Durchmesser [nm]
SPC		75
EPC		86
SPC:Chol	9:1	80
SPC:Chol	7:3	83
SPC:Chol	5:5	93
SPC:SPE	9:1	93
SPC:EPS	9:1	78
SPC:SPG	9:1	65
SPC:SPA	9:1	66
SPC:SS	9:1	90
SPC:DCP	9:1	91
SPC:Chol:SPG	6:3:1	79
SPC(hydriert):Chol:SPG	6:3:1	101

Beispiel B 19 - B 22: Ansätze mit unterschiedlichen Lipidkonzentrationen

Es werden Ansätze aus reinem SPC und Tris-Puffer mit den Lipidkonzentrationen 50, 100, 200 und 400 mg/ml wie unter Beispiel B 6- B 18 beschrieben hergestellt. Die letzte Stufe der Extrusion erfolgte bei einer Porengröße von 0,03 µm. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Liposomengröße in Abhängigkeit von der eingesetzten Lipidkonzentration (Beispiele B 19 - B 22)

Lipidkonzentration [mg/ml]	Mittlerer Durchmesser [nm]
50	64
100	70
200	73
400	74

Beispiel B 23 - B 29: Beeinflussung der resultierenden Vesikeldurchmesser durch die Porengröße der verwendeten Filter

Es werden Ansätze wie unter Beispiel B 6- B 18 hergestellt und charakterisiert, jedoch mit der Änderung, daß die Porengröße des letzten Extrusionsschrittes bei jedem Ansatz variiert wird. Die jeweils letzten Porengrößen sind 5,0, 1,0, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 und 0,03 μm . Als Lipid wird ein Gemisch aus SPC, Chol und SPG (6:3:1) in Tris-Puffer eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Vesikeldurchmesser in Abhängigkeit von der Filterporengröße (Beispiele B 23 - B 29)

Filterporengröße des letzten Extrusionsschritts [μm]	Mittlerer Durchmesser [nm]
5,0	403
1,0	268
0,4	191
0,2	118
0,1	106
0,05	79
0,03	72

Beispiel B 30 - B 33: Einfluß der Passagenanzahl auf die mittleren Vesikeldurchmesser

Es werden vier Ansätze wie unter Beispiel B 6 - B 18 beschrieben, jedoch mit jeweils unterschiedlicher Passagenanzahl (1, 3, 5 und 10) auf jeder Extrusionsstufe hergestellt und charakterisiert. Als Lipid dient ein Gemisch aus SPC, Chol und SPG (6:3:1) in Tris-Puffer. Alle Ansätze werden einem 3-stufigen Extrusionsprozess durch Membranen mit 0,4, 0,1 und 0,03 μm Porengröße unterworfen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Einfluß der Passagenanzahl (Beispiele B 30 - B 33)

Anzahl Passagen pro Filterstufe	Mittlerer Durchmesser [nm]
1	104
3	101
5	91
10	70

Beispiel B 34: Herstellung einer Liposomensuspension ohne vorherige Filmbildung (Direktdispersion)

Es wird ein 100 ml großer Ansatz aus SPC:Chol: SPG (6:3:1) in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 50 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung werden die Lipide direkt in einen 100 ml Meßzylinder eingewogen und mit 70 °C heißem Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (30 min) werden sie mit einem Ultraturrax 30 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert und anschließend wie unter Beispiel B 6 - B 18 beschrieben extrudiert. Das Endprodukt weist einen mittleren Durchmesser von 60 nm bei einem Variationskoeffizienten von 25% auf.

Beispiel B 35: Extrusion unter Verwendung einer Filterporengröße (0,1 µm)

Es wird ein 100 ml großer Ansatz aus EPC in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 100 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung wird das Lipid direkt in einen 100 ml Meßzylinder eingewogen und bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (15 min) wird die Mischung mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert und anschließend je 10 mal über zwei übereinandergelegte 0,1 µm Polycarbonatfilter extrudiert. Das Endprodukt weist einen mittleren Durchmesser von ca. 120 nm bei einem Variationskoeffizienten von 32% auf.

Beispiel B 36: Herstellung eines Großansatzes (1 l Liposomensuspension) mit hohem Durchflußraten

Es wird ein 1000 ml großer Ansatz aus SPC in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 100 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung wird das Lipid direkt in einen 1000 ml Meßzylinder eingewogen und bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (15 min) wird die Mischung mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert und anschließend je 10 mal sequentiell über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter (1,0 - 0,2 und 0,1 µm) extrudiert.

Die Durchflußrate beträgt hierbei unabhängig von der Porengröße der verwendeten Membranen ca. 500 ml/min.

Die nach 10 Passagen über die letzte Filterkombination (0,1 µm) erhaltenen Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von ca. 110 nm bei einem Variationskoeffizienten von 30% auf .

Beispiel B 37: Herstellung eines Ansatzes mit hoher Lipidkonzentration (500 mg/ml)

Es wird ein 100 ml großer Ansatz aus SPC in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 500 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung wird das Lipid direkt in einen 100 ml Meßzylinder eingewogen und bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (30 min) wird die Mischung mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert wobei eine gelartige Konsistenz erhalten wird. Dieses Gel wird anschließend je 2 mal sequentiell über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter (1,0 - 0,2 und 0,1 μm) extrudiert, ohne daß die Membranen verstopfen.

Die nach 2 Passagen über die letzte Filterkombination (0,1 μm) erhaltenen Liposomen (Gel) weisen einen mittleren Durchmesser von ca. 180 nm bei einem Variationskoeffizienten von 41% auf.

Beispiel B 38: Herstellung eines Ansatzes unter Verwendung von Polytetrafluorethylen (PTFE) Filtern

Es wird ein 100 ml großer Ansatz aus SPC in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 100 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung wird das Lipid direkt in einen 100 ml Meßzylinder eingewogen und bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (15 min) wird die Mischung mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert. Anschließend wird diese Vordispersion je 10 mal sequentiell über zwei übereinandergelegte PTFE-filter (5,0 - 1,2 und 0,2 μm) extrudiert.

Die nach 10 Passagen über die letzte Filterkombination (0,2 μm) erhaltenen Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von ca. 210 nm bei einem Variationskoeffizienten von ca. 30% auf.

Beispiel B 39: Herstellung eines Ansatzes unter Verwendung eines Metall(tassen)-filters (5 μm)

Es wird ein 1000 ml großer Ansatz aus SPC in Tris-Puffer mit einer Lipidkonzentration von 100 mg/ml hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung wird das Lipid direkt in einen 1000 ml Meßzylinder eingewogen und bei Raumtemperatur mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (15 min) wird die Mischung mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert und anschließend je 10 mal über einen Metall(tassen)-filter mit einer nominalen Porengröße von 5 μm extrudiert.

Die nach 10 Passagen erhaltenen Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von ca. 1,4 μm bei einem Variationskoeffizienten von ca. 80% auf.

Beispiel B 40: Herstellung von Niosomen

Es wird ein 100 ml großer Ansatz mit 4 g Volpon3 (Polyoxyethylenglykol-laurylalkohol) und 1 g Cholesterol in Tris-Puffer hergestellt. Ohne vorherige Filmbildung werden die Lipide direkt in einen 100 ml Meßzylinder eingewogen und bei RT mit Tris-Puffer versetzt. Nach dem Quellen (15 min) werden sie mit einem Ultraturrax 10 min mit 13500 U/min bei gleicher Temperatur dispergiert und anschließend sequentiell je 5 mal über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter absteigender Porengröße (5,0 - 0,2 und 0,05 μm) extrudiert. Das Endprodukt weist einen mittleren Durchmesser von 53 nm bei einem Variationskoeffizienten von 33% auf.

Beispiel B 41 - B 44: Einschluß von Iopromid unter Verwendung verschiedener Herstellungsmethoden

Es werden wie in Beispiel B 6 - B 18 beschrieben 100 ml Liposomensuspensionen hergestellt, die das wasserlösliche, nicht-ionische Röntgenkontrastmittel Iopromid enthalten. Die Iodkonzentration im Endprodukt beträgt 100 mg/g, die Lipidkonzentration 160 mg/g. Als Lipide werden SPC, Chol und SPG im molaren Verhältnis (6:3:1) verwendet. Als Ausgangslösung wird mit Tris-Puffer verdünntes Ultravist® 370 eingesetzt. Die Porengröße der letzten Extrusionsstufe beträgt 0,1 μm . Die Herstellungsverfahren unterscheiden sich wie folgt:

B 41. Verfahren wie unter Beispiel B 6 beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) extrudiert.

B 42. Verfahren wie unter Beispiel B 41 beschrieben, bei 70° C extrudiert.

B 43. Verfahren wie unter Beispiel B 6 beschrieben; nach der Extrusion durch 0,4 μm Porengröße wird der Ansatz jedoch 3 Gefrier-Tau-Zyklen (Freeze-Thaw) unterworfen. Eingefroren wird in Glasvials in Methanol/Trockeneis bei -70 bis -80° C, aufgetaut im Wasserbad bei +70° C. Extrudiert wird bei Raumtemperatur.

B 44. Verfahren wie unter B 43 beschrieben, jedoch Extrusion bei 70° C.

Zur Charakterisierung der hergestellten Liposomen wird der Einschluß mittels Gleichgewichtsdialyse mit photometrischer Auswertung sowie der mittlere Vesikeldurchmesser mit PCS bestimmt. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Eigenschaften lopromid-haltiger Liposomen

Beispiel	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
41	118	34,1
42	107	34,0
43	117	45,1
44	109	40,8

Beispiel B 45 - B 49: lopromideinschluß und Vesikelgröße in Abhängigkeit von der Porengröße des letzten Extrusionsschrittes

Es werden Ansätze wie unter Beispiel B 43 hergestellt und charakterisiert, jedoch mit der Änderung, daß die Porengröße des letzten Extrusionsschrittes bei jedem Ansatz variiert wird. Die jeweils letzten Porengrößen sind 1,0, 0,4, 0,2, 0,1 und 0,05 µm. Die Freeze-Thaw-Zyklen werden nach Extrusion durch 5,0 µm durchgeführt. Die Lipidkonzentration beträgt 150 mg/ml. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Eigenschaften lopromid-haltiger Liposomen in Abhängigkeit von der Porengröße

Beispiel	Porengröße	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
45	1,0	211	50,6 ± 1,5
46	0,4	207	50,3 ± 1,5
47	0,2	164	45,0 ± 0,5
48	0,1	117	40,6 ± 0,8
49	0,05	87	34,2 ± 0,5

Beispiel B 50 - B 53: lopromideinschluß und Vesikelgröße in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Es werden Ansätze wie unter Beispiel B 43 hergestellt und charakterisiert, jedoch mit der Änderung, daß verschiedene Lipidkonzentrationen (50, 100, 150 und 160 mg/ml) eingesetzt werden. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Eigenschaften Iopromid-haltiger Liposomen in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Beispiel	Lipidkonzentration [mg/g]	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
50	50	116	19,3 ± 1,2
51	100	115	27,9 ± 0,6
52	150	104	40,2 ± 1,1
53	160	117	45,1 ± 1,9

Beispiel B 54: Drei-Monats-Stabilität von Iopromidliposomen

Zur Beurteilung der Stabilität von Iopromidliposomen wird ein 3-Fachansatz nach 3-monatiger Lagerung im Kühlschrank hinsichtlich des pH, des Einschlusses und der Vesikelgröße untersucht. Bei den eingelagerten Proben wird der unverkapselte Iopromidanteil vor der Einlagerung nicht entfernt, d.h. die extrudierten Liposomen werden direkt eingelagert.

Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt die Eigenschaften der entsprechenden Liposomen zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Tabelle 8: Stabilität von Iopromidliposomen

Ansatz	pH nach Herstellung	pH nach 3 Monaten	Einschluß (%) nach Herstellung	Einschluß (%) nach 3 Monaten	mittl. Durchm./VK (nm/%) nach Herstellung	mittl. Durchm./VK (nm/%) nach 3 Monaten
a	7,3	7,2	39,6	38,4	99/32	101/30
b	7,2	7,2	41,4	40,8	107/30	114/33
c	7,2	7,2	39,5	40,3	107/36	111/36
mean:	7,2	7,2	40,2	39,8	104/33	109/33

Beispiel B 55- B 57: Einschluß von Gd-DTPA unter Verwendung verschiedener Herstellungsmethoden

Es werden wie unter Beispiel B 6 - B 18 beschrieben 100 ml Liposomensuspensionen hergestellt, die das wasserlösliche, ionische MRT-Kontrastmittel Gadopentetsäure-Dimegluminsalz (im folgenden nur Gd-DTPA genannt) enthalten. Die Gd-Konzentration im Endprodukt beträgt 180 µmol/g, die Lipidkonzentration 150 mg/g. Als Lipide werden SPC und Chol im molaren Verhältnis (7:3) verwendet. Als Ausgangslösung wird mit

Wasser 1:1 verdünntes Magnevist® eingesetzt. Die Porengröße der letzten Extrusionsstufe beträgt 0,1 µm. Die Herstellungsverfahren unterscheiden sich wie folgt:

B 55. Verfahren wie unter Beispiel B 6 beschrieben, bei Raumtemperatur extrudiert.

B 56. Verfahren wie unter Beispiel B 6 beschrieben, bei 70° C extrudiert.

B 57. Verfahren wie unter Beispiel B 6 beschrieben, nach der Extrusion durch 0,4 µm Porengröße wird der Ansatz jedoch 3 Gefrier-Tau-Zyklen (Freeze-Thaw) unterworfen. Eingefroren wird in Glasvials in Methanol/Trockeneis bei -70 bis -80° C, aufgetaut im Wasserbad bei +70° C. Extrudiert wird bei Raumtemperatur.

Zur Charakterisierung der hergestellten Liposomen wird der Einschluß mittels Gleichgewichtsdialyse und Inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectrometry (ICP-AES) sowie der mittlere Vesikeldurchmesser mit PCS bestimmt. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Eigenschaften Gd-DTPA-haltiger Liposomen

Beispiel	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
55	110	44,2 ± 0,5
56	103	47,9 ± 0,8
57	101	49,5 ± 5,1

Beispiel B 58 - B 60: Gd-DTPA-Einschluß und Vesikelgröße in Abhängigkeit von der Porengröße des letzten Extrusionsschrittes

Es werden Ansätze wie unter Beispiel B 57 hergestellt und charakterisiert, jedoch mit der Änderung, daß die Porengröße des letzten Extrusionsschrittes bei jedem Ansatz variiert wird. Die jeweils letzten Porengrößen sind 0,2, 0,1 und 0,05 µm. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Eigenschaften Gd-DTPA-haltiger Liposomen in Abhängigkeit von der Porengröße

Beispiel	Porengröße	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
58	0,20	158	50,1 ± 2,8
59	0,10	113	46,3 ± 1,8
60	0,05	84	43,2 ± 0,4

Beispiel B 61 - B 63: Gd-DTPA-Einschluß und Vesikelgröße in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Es werden Ansätze wie unter Beispiel B 57 hergestellt und charakterisiert, jedoch mit der Änderung, daß verschiedene Lipidkonzentrationen (100, 150 und 200 mg/ml) eingesetzt werden. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten der Ergebnisse aus je drei Ansätzen sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Eigenschaften Gd-DTPA-haltiger Liposomen in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration

Beispiel	Lipidkonzentration [mg/g]	Mittlerer Durchmesser [nm]	Einschluß [%]
61	100	107	37,9 ± 0,8
62	150	101	49,5 ± 5,1
63	200	114	61,5 ± 0,9

Beispiel B 64: Herstellung von Liposomen mit einem lipophilen Arzneistoff (Methylprednisolonaceponat - MPA)

20 ml Plazeboliposomen bestehend aus 50 mg SPC/ml, welche gemäß Beispiel 1, jedoch mit 0,2 µm als letzter Extrusionsstufe, hergestellt wurden, werden mit 50 mg MPA versetzt und anschließend bei Raumtemperatur 24 h mit einem Magnetrührer gerührt.

Die so erhaltenen Liposomen weisen einen mittleren Durchmesser von 189 nm bei einem Variationskoeffizienten von 30% auf. Das MPA ist vollständig in den Liposomen verkapselt.

Beispiel B 65: Herstellung einer 5%-igen O/W-Emulsion

1,5 g Lipoid E 80 werden in etwa 50 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und anschließend 5 ml filtrierte Sojaöl (beides Lipoid KG, Ludwigshafen) hinzugefügt. Nach Zusatz von bidestilliertem Wasser ad 100 ml wird die Mischung 10 min mit einem Ultra-Turrax (13500U/min) vordispersiert. Anschließend wird diese Vordispersion je 10 mal über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter (0,1 µm) extrudiert. Die Tröpfchengröße der so erhaltenen homogenen, gelblich-trüben O/W-Emulsion beträgt ca. 430 nm.

Beispiel B 66: Herstellung einer 5%-igen O/W-Emulsion unter Verwendung eines PTFE-Filters

1,5 g Lipoid E 80 werden in etwa 50 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und anschließend 5 ml filtrierte Sojaöl (beides Lipoid KG, Ludwigshafen) hinzugefügt. Nach Zusatz von bidestilliertem Wasser ad 100 ml wird die Mischung 10 min mit einem Ultra-Turrax (13500U/min) vordispersiert. Anschließend wird diese Vordispersion je 10 mal über zwei übereinandergelegte PTFE-filter (0,2 µm) extrudiert. Die Tröpfchengröße der so erhaltenen homogenen, gelblich-trüben O/W-Emulsion beträgt ca. 230 nm.

Beispiel B 67: Herstellung einer 20%-igen O/W-Emulsion

1 g Cremophor S9 (BASF) wird in etwa 50 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und anschließend 20 ml filtrierte Sojaöl (Lipoid KG, Ludwigshafen) dazugefügt. Nach Zusatz von bidestilliertem Wasser ad 100 ml wird die Mischung 1 min mit einem Ultra-Turrax (8000U/min) vordispersiert. Anschließend wird diese Vordispersion je 10 mal über zwei übereinandergelegte Polycarbonatfilter (0,1 µm) extrudiert. Die Tröpfchengröße der so erhaltenen homogenen, milchig-trüben O/W-Emulsion beträgt ca. 880 nm.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vordispersion unter hohem Druck von 6,6 bis 250 MPa sequentiell über 1 bis 8 Filterstufen zwischen 0,01 und 35 µm extrudiert.
2. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Vordispersion über Filter aus anorganischen Materialien extrudiert
3. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Vordispersion über Membranfilter extrudiert.
4. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Dispersionen über 2 bis 4 übereinandergelegte Membranfilter pro Filtrationsstufe extrudiert.
5. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die übereinandergelegten Filter unterschiedliche Porengrößen aufweisen.
6. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Extrusion kontinuierlich erfolgt.
7. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Dispersion sequentiell über Filter absteigender Porengröße extrudiert.
8. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 20 Filterpassagen pro Filtrationsstufe angewendet werden.
9. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, daß die in einem Gang herzustellenden Produktmengen oberhalb 100 ml liegen.

10. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 9 dadurch gekennzeichnet, daß die Produktflüsse oberhalb 150 ml pro Minute liegen.
11. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß das disperse System eine Emulsion ist.
12. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß das disperse System eine Liposomensuspension ist.
13. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Röntgenkontrastmittel enthalten.
14. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Röntgenkontrastmittel Iotrolan, Iopromid oder 3-Carbamoyl-5-[N-(2-hydroxyethyl)-acetamido]-2,4,6-triiod-benzoesäure-[(1RS, 2SR)-2,3-dihydroxy-1-hydroxymethylpropyl]-amid enthalten.
15. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese NMR-Kontrastmittel enthalten.
16. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß diese als NMR-Kontrastmittel Gd-DTPA, Gd-EOB oder Gadobutrol enthalten.
17. Verfahren zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltenen Dispersionen steril sind.
18. Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gekennzeichnet durch ein Vorratsgefäß, dessen Abflußleitung zu einer Hochdruckpumpe führt, die zum Aufbau von Arbeitsdrücken bis maximal 250 MPa ausgelegt ist, welche ihrerseits mit einem zur Aufnahme der erfindungsgemäß verwendeten Filter

bestimmten Filterhalter verbunden ist, von dem das Produkt über eine Abflußleitung entweder in das Vorratsgefäß rezirkuliert und/oder entnommen wird.

19. Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Hochdruckpumpe zum Aufbau von Arbeitsdrücken bis maximal 80 MPa ausgelegt ist.
20. Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Hochdruckpumpe und Filterhalter zusätzlich noch ein Vorfilterhalter angebracht ist, der zur Aufnahme von Filtern mit einer mittleren Porengröße von 2 bis 35 µm bestimmt ist.
21. Vorrichtung zur Herstellung flüssiger, disperser Systeme gemäß Patentanspruch 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß diese zusätzlich noch mit Entlüftungsvorrichtungen und/oder Temperatur- und Druckmeßgeräten ausgestattet ist.

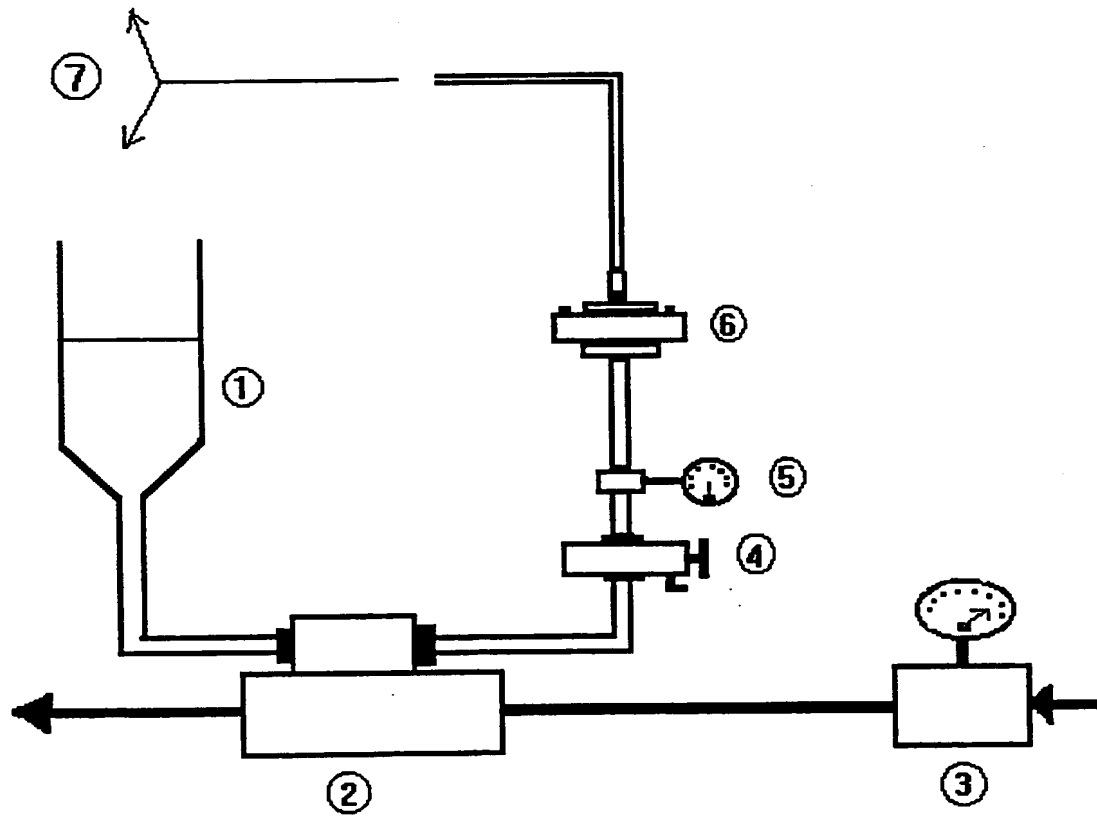


Abb. 1: Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Apparatur

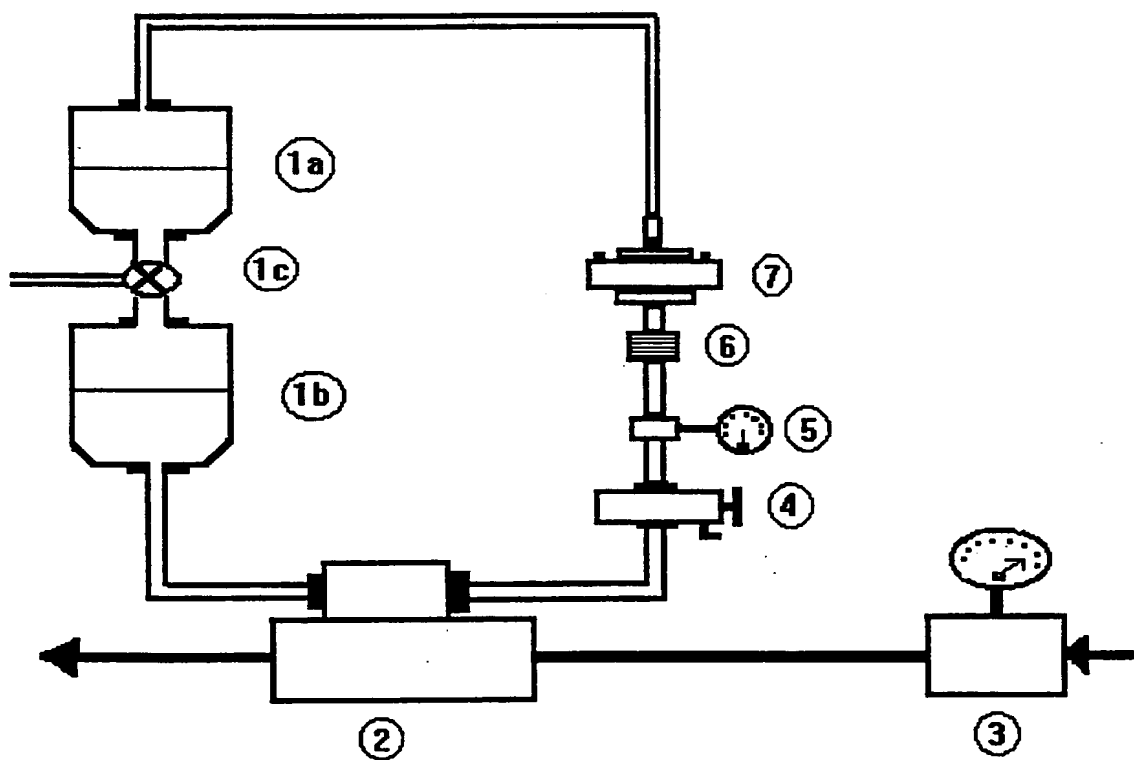


Abb. 2: Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Apparatur

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 93/00997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K49/00 A61K49/04 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,39 33 938 (EDMUND BÜHLER GMBH) 18 April 1991 see the whole document ---	1,3-7,12
X	WO,A,86 00238 (THE LIPOSOME COMPANY) 16 January 1986 cited in the application see page 19, line 11 - line 32 ---	1,2,6,8, 18
X	WO,A,92 05772 (THE LIPOSOME COMPANY) 16 April 1992 see page 7, line 5 - page 8, line 28 ---	1,2,12, 17,18
Y	EP,A,0 460 720 (THE LIPOSOME COMPANY) 11 December 1991 see claims 1-3; example 11 --- -/--	1,2,8,12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 1993

Date of mailing of the international search report

1 8. 01. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gonzalez Arias, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 93/00997

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 036 676 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30 September 1981 see page 21, line 5 - page 24, line 21 ----	1,2,8,12
A,P	EP,A,0 535 567 (B,BRAUN MELSUNGEN AG) 7 April 1993 see claim 1 ----	1,11,12, 17
A	US,A,5 078 986 (BOSWORTH,M.E.) 7 January 1992 see abstract; example 7 ----	15,16
A	WO,A,91 05599 (SCHERING AG) 2 May 1991 see page 9, line 8 - line 15 -----	13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 93/00997

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3933938	18-04-91	NONE	
WO-A-8600238	16-01-86	CA-A- 1264668	23-01-90
		EP-A, B 0185756	02-07-86
		JP-T- 61502452	30-10-86
		US-A- 5008050	16-04-91
WO-A-9205772	16-04-92	AU-A- 8945091	28-04-92
		CA-A- 2091776	06-04-92
		EP-A- 0552299	28-07-93
EP-A-0460720	11-12-91	US-A- 4861580	29-08-89
		AU-A- 6543786	05-05-87
		CA-A- 1315678	06-04-93
		EP-A- 0243446	04-11-87
		JP-T- 63501569	16-06-88
		WO-A- 8702219	23-04-87
		US-A- 5041278	20-08-91
		US-A- 5234634	10-08-93
EP-A-0036676	30-09-81	US-A- 4263428	21-04-81
		EP-A, B 0004467	03-10-79
		JP-A- 54148772	21-11-79
		US-A- 4529561	16-07-85
EP-A-0535567	07-04-93	DE-A- 4132677	08-04-93
US-A-5078986	07-01-92	NONE	
WO-A-9105599	02-05-91	DE-A- 3934656	18-04-91
		AU-A- 6460090	18-04-91
		CA-A- 2027527	14-04-91
		EP-A- 0451236	16-10-91
		JP-T- 4502124	16-04-92
		US-A- 5110475	05-05-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 93/00997

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61K49/00 A61K49/04 A61K9/127

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 5 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE,A,39 33 938 (EDMUND BÜHLER GMBH) 18. April 1991 siehe das ganze Dokument ----	1,3-7,12
X	WO,A,86 00238 (THE LIPOSOME COMPANY) 16. Januar 1986 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 19, Zeile 11 - Zeile 32 ----	1,2,6,8, 18
X	WO,A,92 05772 (THE LIPOSOME COMPANY) 16. April 1992 siehe Seite 7, Zeile 5 - Seite 8, Zeile 28 ----	1,2,12, 17,18
Y	EP,A,0 460 720 (THE LIPOSOME COMPANY) 11. Dezember 1991 siehe Ansprüche 1-3; Beispiel 11 ----- -/--	1,2,8,12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Dezember 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18.01.94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gonzalez Arias, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 93/00997

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 036 676 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30. September 1981 siehe Seite 21, Zeile 5 - Seite 24, Zeile 21 ---	1,2,8,12
A,P	EP,A,0 535 567 (B,BRAUN MELSUNGEN AG) 7. April 1993 siehe Anspruch 1 ---	1,11,12,17
A	US,A,5 078 986 (BOSWORTH,M.E.) 7. Januar 1992 siehe Zusammenfassung; Beispiel 7 ---	15,16
A	WO,A,91 05599 (SCHERING AG) 2. Mai 1991 siehe Seite 9, Zeile 8 - Zeile 15 -----	13-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 93/00997

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-3933938	18-04-91	KEINE	
WO-A-8600238	16-01-86	CA-A- 1264668	23-01-90
		EP-A, B 0185756	02-07-86
		JP-T- 61502452	30-10-86
		US-A- 5008050	16-04-91
WO-A-9205772	16-04-92	AU-A- 8945091	28-04-92
		CA-A- 2091776	06-04-92
		EP-A- 0552299	28-07-93
EP-A-0460720	11-12-91	US-A- 4861580	29-08-89
		AU-A- 6543786	05-05-87
		CA-A- 1315678	06-04-93
		EP-A- 0243446	04-11-87
		JP-T- 63501569	16-06-88
		WO-A- 8702219	23-04-87
		US-A- 5041278	20-08-91
		US-A- 5234634	10-08-93
EP-A-0036676	30-09-81	US-A- 4263428	21-04-81
		EP-A, B 0004467	03-10-79
		JP-A- 54148772	21-11-79
		US-A- 4529561	16-07-85
EP-A-0535567	07-04-93	DE-A- 4132677	08-04-93
US-A-5078986	07-01-92	KEINE	
WO-A-9105599	02-05-91	DE-A- 3934656	18-04-91
		AU-A- 6460090	18-04-91
		CA-A- 2027527	14-04-91
		EP-A- 0451236	16-10-91
		JP-T- 4502124	16-04-92
		US-A- 5110475	05-05-92